

ПЛЕЙОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ НА МАКРОФАГАЛЬНУЮ ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ FcR-ЗАВИСИМОМ ФАГОЦИТОЗЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Результаты исследования, представленные в настоящей работе раскрывают некоторые аспекты действия модуляторов клеточных функций в отношении свободно-радикальных процессов, ассоциированных с фагоцитарной генерацией АФК. Впервые на биологически релевантной модели показана плейотропная природа антиоксидантного действия ряда биологически активных соединений и установлены универсальные паттерны плейотропности, присущие ингибиторам Nox2-зависимой генерации АФК.

Ключевые слова: биологически активные соединения, макрофаги, Nox2, плейотропность.

N.A. Bizunok

THE CELL FUNCTION MODULATORS PLEIOTROPY IN ORDER TO REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION BY MACROPHAGES AT THE FcR-DEPENDENT PHAGOCYTOSIS

The results shown in this article find out some aspects of antioxidant activity a number of cell function modulators in regards to free radicals reactions, associated with ROS generation by phagocytes. In first time proved the pleiotropy of antioxidant action for some high activity natures and discovered the universal patterns of pleiotropy immanent for Nox2-dependent ROS generation.

Key words: cell function modulators, macrophages, Nox2, pleiotropy.

Современные представления о механизмах активации Nox2 при Fc γ R-зависимом фагоцитозе отводят важнейшее значение инозитол-3-фосфату (PIP $_3$) и катионам Ca $^{2+}$, а также ассоциированным с ними механизмам внутриклеточной сигнализации. Эти пути инициируются активацией при стимуляции рецепторов, ассоциированных с Gi-протеинами, например, CD14-TLR-4 макрофагов, с которыми взаимодействуют бактериальные липополисахариды (ЛПС) /1/. Сигнальные каскады, индуцируемые их связыванием на фагоците, подробно описаны ранее для Fc γ R-зависимого фагоцитоза /2/. Блокада этих механизмов за счет прямых ингибиторных влияний или включения альтернативных путей внутриклеточного сигналинга должна приводить к подавлению активности Nox2, что является целью фармакотерапевтического воздействия при избыточной активации фермента. При этом одним из наиболее доказанных конкурентных путей для PIP $_3$ в фагоцитах является аденилатциклазный каскад внутриклеточных событий, включающий накопление цАМФ с последующей активацией протеинкиназы А (РКА), индуцирующей несколько ответов, важнейшим из которых является инактивация пути c-Raf-1/Erk через подавление фосфорилирования c-Raf протеина /3/. Аденилатциклазы ассоциированы с Gs-протеинами, которые в свою очередь связаны со множеством 7-TMS рецепторов, представленных на мембране макрофага, включая рецепторы вазоактивного интестинального пептида, вазопрессина, простаглицина, паратиреоидного гормона, гистамина и серотонина, а также β -адренергические рецепторы /1/. С позиции фармакологического управления активностью Nox2 последние привлекают особое внимание, поскольку множество лекарственных средств, используемых в клинической практике при патологии, ассоциированной с оксидантным стрессом и гиперактивностью Nox2 (атеросклероз, эндотелиальная дисфункция, вазоспазм, воспаление и др. /4/) являются агонистами или антагонистами этих рецепторов. С другой стороны, в медицинской практике широко используются прямые модуляторы внутриклеточного уровня цАМФ, такие как ингибиторы фосфодиэстераз (ФДЭ) и модуляторы цитоархитектоники. Изучение индивидуальных фармакодинамических эффектов лекарственных средств, потенциально спо-

собных модифицировать активность Nox2, а также определение паттернов индивидуальной кросс-регуляции основных внутриклеточных каскадов, управляющих активностью Nox2, представляют фундаментальный и прикладной интерес, так как лежат в основе разработки новых лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний, ассоциированных с дисрегуляцией этого ферментного комплекса.

Целью настоящей работы является широкое обсуждение нового взгляда на природу ингибирующего действия биологически активных соединений в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах, возникшего на основе анализа результатов многолетних исследований автора. Сущность действия соединений различных фармакологических групп, обсуждаемых в настоящей работе, была представлена в научной периодике ранее /2, 5-10/.

Материалы и методы

Настоящее исследование основывается на результатах испытания более 70 индивидуальных соединений различного фармакодинамического профиля, включая модуляторы уровня цАМФ, агонисты и антагонисты Gi-, Gs-, Gq-рецепторов, модуляторы уровня PIP $_3$, Ca $^{2+}$ -токов, структуры и функции цитоскелета, ингибиторы ферментативной деградации арахидоновой кислоты (AA), аминокислоты, метаболитические соединения. Каждое соединение испытывали в широком диапазоне концентраций, составлявшем, как правило, от 10 $^{-9}$ до 10 $^{-3}$ М. Качество субстанций испытанных соединений соответствовало требованиям, предъявляемым к исследованию, проводимым на клеточных культурах. Большинство субстанций приобретено в «Sigma-Aldrich», Германия, США; аминокислоты и их производные синтезированы и предоставлены для исследования Институтом физико-органической химии НАН, Беларусь.

Среды и реагенты. Помимо испытанных модуляторов клеточных функций в работе использовали люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma-Aldrich», Германия; среду Хенкса без индикатора – ФГУП «ИПВЭ», Россия; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимо-

зан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

Выделение макрофагов. Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах крыс-самцов линии Вистар массой 180–220 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках, макрофаги составляли около 90%.

Изучение респираторного взрыва. Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251-002 (Финляндия). Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемым агентом в интервале концентраций 10^{-9} – 10^{-3} М при температуре 20–25°C; контрольные пробы агентов не содержали. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал группу проб, содержащих индуктор фагоцитоза, в которых оценивали индуцированную хемилюминесценцию (ИХЛ), и группу проб, лишенных индуктора, для регистрации спонтанной хемилюминесценции (СХЛ). При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10^6 жизнеспособных макрофагов, люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М), опсонизированный зимозан ($5 \cdot 10^7$ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемое вещество, в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды. Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемый агент, и контрольных, при постоянной температуре (37°C), в дискретном режиме с интервалом 2–3 мин, на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC ХЛ) и площади под кривой СХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC ХЛ). При описанном дизайне эксперимента последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы фагоцитов (Nox2, EC 1.6.3.1) в продукцию общего пула АФК. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 8.

Статистический анализ. Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки <5% ($p < 0,05$). Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации (IC_{16} – IC_{84}) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6.1» и математических преобразований по Chou /11/ при помощи специально разработанного интерактивного алгоритма.

Анализ паттернов плейотропности выполнялся на основе коэффициентов относительной активности (K_{16-84}), которые рассчитывались по формуле:

$$K_{j-n} = \left(\sum_{j=1}^n \frac{IC_{x(DAUC)}}{IC_{x(AUC)}} \right) / n$$

$IC_{x(DAUC)}$ – ингибирующая концентрация соединения в отношении Nox2-зависимой генерации АФК на x уровне эффекта;

$IC_{x(AUC)}$ – ингибирующая концентрация соединения в отношении совокупной генерации АФК на x уровне эффекта;

n – количество учитываемых уровней эффекта.

Результаты и обсуждение

Способность макрофагов к генерации АФК по Nox2-зависимому механизму угнетается фармакологическими агентами и лекарственными средствами, действие которых реализуется с участием α АМФ (β -адренергическими агонистами изопrenalином ($IC_{50} = 12,9$ мкМ) и салбутамолом ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -23,3\%$), неизбирательными агонистами 5-HT_{1.5} рецепторов серотонином ($IC_{50} = 33,9$ мкМ) и H_{1.3} рецепторов гистамина ($EC_{max} = 100,0$ мкМ; $E_{max} = -21,7\%$), ингибиторами фосфодиэстераз ($IC_{50} = 2,57$ мкМ (Изобутил-метил-ксантин-ИБМК)), препаратами α АМФ ($IC_{50} = 120,2$ мкМ (Дибутрил- α АМФ)), блокаторами Ca²⁺-каналов L-типа – нифедипином ($IC_{50} = 1,4$ мкМ)

и верапамилом ($IC_{50} = 83,2$ мкМ), агонистами пуриновых рецепторов I-типа (аденозином ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -24,0\%$) и инозином ($EC_{max} = 1,0$ мкМ; $E_{max} = -42,4\%$) и II-типа (АТФ ($IC_{50} = 288,4$ мкМ), АДФ ($IC_{50} = 95,5$ мкМ), АМФ ($IC_{50} = 120,2$ мкМ)). Среди аминокислот и их производных ингибирующим действием обладают ацетилированные производные L-пролина – N-ацетил-4-гидроксипролин ($IC_{50} = 42,7$ мкМ), N-ацетил-L-пролин ($IC_{50} = 309,0$ мкМ), L-аргинин ($IC_{50} = 2,7$ мМ), таурин ($IC_{50} = 5,1$ мМ), L-триптофан при концентрациях >10,0 мкМ, а также ацетил-L-карнитин ($IC_{50} = 120,2$ мкМ). Ингибируют Nox2-зависимую генерацию АФК также цитоактивные агенты различной структуры – блокаторы Na⁺-каналов (прокаиин ($IC_{50} = 60,3$ мкМ), лидокаиин ($IC_{50} = 33,1$ мкМ), бупивакаин ($IC_{50} > 170,0$ мкМ)), хинидин, блокирующий также K⁺-каналы ($IC_{50} = 85,1$ мкМ)), ингибитор Na⁺/K⁺ АТФ-азы строфантин ($IC_{50} = 8,3$ мкМ), блокатор тубулина колхицин ($IC_{50} = 12,9$ мкМ), а также глюкокортикостероиды – преднизолон ($EC_{max} = 0,1$ мМ; $E_{max} = -37,2\%$) и дексаметазон ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -28,1\%$).

Макрофагальную генерацию АФК усиливают от 40 до 250% агонисты 7-TMS рецепторов, преимущественно асцирированных с PIP₃-зависимыми каскадами внутриклеточной передачи сигнала: α_1 -адренергический агонист фенилэфрин ($EC_{max} = 1,0$ мкМ; $E_{max} = +48,8\%$), неизбирательный агонист адренергических рецепторов эпинефрин ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +86,5\%$), неизбирательный агонист D_{1.5} рецепторов дофамина ($EC_{max} = 1,0$ нМ; $E_{max} = +115,7\%$). Среди аминокислот и их производных стимулирующим действием обладают селенин L-аргинина ($EC_{max} = 1,0$ мМ; $E_{max} = +147,1\%$) и триптофан ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +57,9\%$). Стимулирующим действием в терапевтических диапазонах концентраций обладают ингибиторы ЦОГ: кислота ацетилсалициловая ($EC_{max} = 1,0$ мМ; $E_{max} = +29,6\%$), диклофенак ($EC_{max} = 1,0$ мкМ; $E_{max} = +29,0\%$), мелоксикам ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +31,0\%$), целекоксиб ($EC_{max} = 10,0$ нМ; $E_{max} = +105,1\%$).

Итак, исследование показало, что испытанные биологически активные соединения различным образом модифицируют генерацию АФК в макрофагах. Одни из них обладали подобно фенилэфрину дозозависимым стимулирующим действием, другие, такие как дофамин, триптофан или ингибиторы ЦОГ, бимодально модифицировали образование оксидантов, большинство же ингибировало этот процесс. Наблюдение о превалировании ингибирующего действия в группе природных эндогенных биорегуляторов свидетельствует в пользу того, что гиперактивность ферментов семейства Nox с биологических позиций может представлять большую опасность, чем их недостаточность.

Раздельный анализ активности испытанных биомодуляторов в отношении совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК позволил выявить важные закономерности их действия. Действие большинства модуляторов, работающих в качестве прямых ингибиторов активности ферментных каскадов, ионных токов или функций цитоскелета, в целом находится в соответствии с современными представлениями о механизмах активации Nox2 макрофагов при FcR-зависимом фагоцитозе. Что касается агонистов 7-TMS рецепторов, то исследование не позволило установить устойчивой взаимосвязи между сопряжением рецептора с определенным типом G-протеина и его эффектом в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. В совокупности с современными представлениями о природе действия агонистов 7-TMS рецепторов это заставляет подвергать сомнению устоявшиеся представления о фармакодинамике известных ныне лекарственных средств и искать новые подходы к оценке их биологического действия.

Одним из таких подходов является развитие представлений о плейотропной природе действия биологически активных соединений. Под плейотропностью в данном контексте понимается зависимость ответа эффекторной системы от двух и более механизмов действия биологически активного соединения, способных в процессе взаимодействия формировать его индивидуальный фармакодинамический профиль. По существу, плейотропность является имманентным свойством всех биологически активных соединений, ответственным за формирование их индивидуального биомодулирующего потенциала и дозовых закономерностей

действия. Однако это свойство не учитывается в современной экспериментальной фармакологии и молекулярной медицине, как существенное, что неизбежно отражается в упрощенных представлениях о биологическом (фармакологическом) действии соединений и ведет к неэффективному их использованию в практической медицине.

Паттерны плейотропности биологически активных соединений в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. До сих пор в фармакологии существовало представление о том, что основным биологическим проявлением плейотропного действия является би- или полимодальный характер зависимости эффекта от дозы лекарственного средства. На самом деле плейотропность должна сопутствовать любым видам зависимости «доза-эффект» и определять не только её характер как таковой, но и различные возможности управления эффектом лекарственных средств. С этих позиций актуальны доказательства плейотропности для эффектов, прямолинейно зависящих от концентрации, которые объяснялись до последнего времени единственным механизмом биологического действия.

Анализ ингибирующего действия испытанных в настоящем исследовании соединений, демонстрировавшего, на первый взгляд, прямолинейную зависимость «концентрация-эффект» в полулогарифмических координатах, с использованием коэффициентов $K_{16-K_{84}}$ позволил разделить все соединения на 3 группы (рисунок 1).

Характер динамических изменений $K_{16-K_{84}}$ по мере прироста эффекта (и, вместе с тем, концентрации) и сопоставление этих данных с современными представлениями о молекулярных механизмах действия испытанных соединений, позволили описать основные паттерны плейотропности в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах. Эти паттерны имеют универсальный биологический характер и применимы к анализу плейотропного действия в отношении любой составляющей сложного биологического процесса.

Первую группу сформировали соединения, демонстрировавшие постоянство $K_{16-K_{84}}$ во всем эффективном диапазоне или прямолинейное изменение этих коэффициентов по мере прироста эффективности. Формируемый при этом **паттерн плейотропности получил название «паралельной»**. Применительно к настоящей модели формирования является постоянство плейотропного действия в отношении Nox2-зависимой генерации АФК при любых концентрациях биологически активного соединения. Этот паттерн реализуют все испытанные антагонисты 7-TMS рецепторов, блокаторы натриевых каналов за исключением лидокаина, верапамила, а также агонисты 7-TMS рецепторов АДФ и серотонина. Кроме того, этот паттерн присущ соединениям, реализующим в настоящей модели прямое антирадикальное (монотропное) действие.

В свою очередь, можно выделить субварианты паттерна параллельной плейотропности:

паттерн параллельной симбатной плейотропности при $K_{16-K_{84}} > 1,0$ – демонстрирует высокий тропизм к целевому эффектору;

паттерн параллельной несимбатной плейотропности при $K_{16-K_{84}} < 1,0$ – демонстрирует высокий тропизм к альтернативным эффекторам;

паттерн параллельной нейтральной плейотропности при $K_{16-K_{84}} \approx 1,0$ – демонстрирует отсутствие тропизма.

Применительно к настоящему исследованию, все соединения, демонстрировавшие паттерн параллельной плейотропности обладали свойством нейтральности в отношении Nox2-зависимой

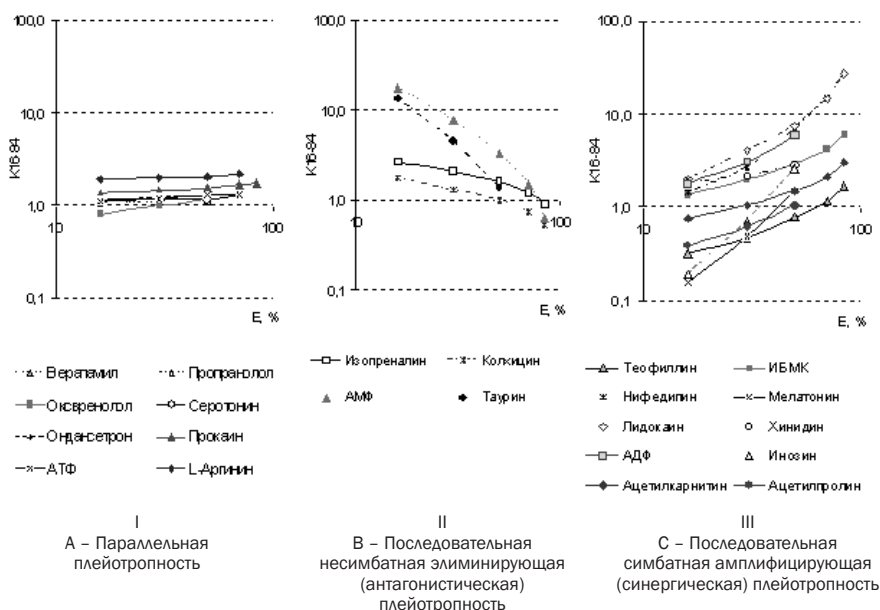


Рисунок 1 – Основные паттерны плейотропности ингибиторов Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах при FcR-индуцированном фагоцитозе

генерации АФК, за исключением прокаина и L-аргинина, демонстрировавших свойство симбатности (рисунок 1 – А).

Вторую группу сформировали такие соединения, как колхицин, таурин и 7-TMS агонисты изопреналин и АМФ. Этот паттерн отличает экспоненциальное, несимбатное приросту эффективности снижение коэффициентов $K_{16-K_{84}}$ по мере прироста концентрации биологически активного соединения (рисунок 1 – В). Этот паттерн можно назвать **«последовательная несимбатная элиминирующая (антагонистическая) плейотропность»**. Условием его формирования является последовательное, зависимое от концентрации включение различных антагонистических или конкурирующих механизмов модификации Nox2-зависимого процесса, определяющих экспоненциальный характер падения эффективности в отношении этой компоненты совокупной клеточной генерации АФК. Для каждого биологически активного соединения механизм формирования этого паттерна индивидуален, однако все соединения, его демонстрирующие, теряют свою эффективность в отношении Nox2-зависимой генерации АФК по мере прироста их концентрации в тест-системе.

Следующий паттерн – **«последовательная симбатная амплифицирующая (синергическая) плейотропность»** (рисунок 1 – С). Она характеризуется экспоненциальным симбатным приросту эффективности увеличением коэффициентов $K_{16-K_{84}}$ по мере прироста концентрации биологически активного соединения. Условием формирования этого паттерна в настоящем исследовании является последовательное, зависимое от концентрации включение взаимно усиливающих влияний в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, определяющих экспоненциальный характер прироста эффективности в отношении этой компоненты совокупной клеточной продукции оксидантов. В настоящем исследовании этот тип плейотропности демонстрировали нифедипин, хинидин, инозин, АДФ, мелатонин, ацетилпролин, а также транс-ресвератрол – антиоксидант, реализующий также и прямое ингибирующее действие в отношении Nox2 фагоцитов /12/.

Таким образом, в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах паттерны плейотропности соединений, ингибирующих этот процесс, сводятся к трем основным типам, два из которых демонстрируют экспоненциальное усиление (последовательный амплифицирующий) или ослабление (последовательный элиминирующий) плейотропного действия, третий (паттерн параллельной плейотропности) – постоянство плейотропного действия в диапазоне эффективных концентраций. Молекулярные механизмы, лежащие в основе плейотропности индивидуальны



и определяются не только физико-химическими свойствами соединений и тропностью к молекулярной мишени, но и сложными взаимодействиями различных внутриклеточных сигнальных механизмов при индукции клеточного ответа.

Результаты исследования, представленные в настоящей работе, имеют фундаментальное значение, поскольку расширяют современные представления об арсенале и характере действия модуляторов клеточной Nox2-зависимой генерации АФК. Вместе с тем они позволяют избирать соединения, обладающие высоким тропизмом к Nox2-ассоциированной генерации АФК, представляющие интерес с позиции разработки средств лечения патологических процессов, ассоциированных с оксидантным стрессом.

Литература

1. Magocsi, M. Multiple G-protein-coupling specificity of β -adrenoceptor in macrophages / M. Magocsi [et al]. // Immunology. 2007. V.122. P.503-513.
2. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические иммуномодулирующие взаимодействия изопротеренола, нифедипина, изобутил-метилксантина, колхицина и транс-ресвератрола на модели дыхательного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. 2011. №3. С. 134-143.
3. Cook, S.J. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf / S.J. Cook, F. McCormick // Science. 1993. V.262. P. 1069-1072.
4. Jones, D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2008. V.295. P. C849-C868.
5. Бизунок, Н.А. Биогенные амины – эндогенные модуляторы кле-

точной генерации активных форм кислорода / Н. А. Бизунок // Медицинский журнал. 2004. №4. С. 34-36.

6. Бизунок, Н.А. Влияние цитоактивных агентов на НАДФ-оксидазную генерацию активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Рецепт. 2006. №1. С. 36-39.

7. Бизунок, Н.А. Производные аминокислот – потенциальные модификаторы клеточной продукции оксидантов / Н.А. Бизунок // Рецепт. 2006. №3. С. 28-32.

8. Бизунок, Н.А. Мелатонин модулирует генерацию активных форм кислорода в клеточных системах / Н.А. Бизунок // Вести НАН Беларуси. Медицинская серия. 2006. №4. С. 84-87.

9. Бизунок, Н.А. Влияние адренергических средств на НАДФН-оксидазную продукцию активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. №2.. С. 43-46.

10. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические иммуномодулирующие взаимодействия пуринов на модели дыхательного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. 2011. №3. С. 9-13.

11. Chou T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies/ T-Ch Chou// Pharmacological reviews. 2006. V. 58. P. 621-681.

12. Orallo, F. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption / F. Orallo [et al]// Molecular pharmacology. 2002. V.61. N.2. P.294-302.

Поступила 5.01.2013 г.